

## 日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

|                   |     |
|-------------------|-----|
| 23.03.00          |     |
| REC'D 19 MAY 2000 |     |
| WIPO              | PCT |

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1999年 3月26日

出 願 番 号

Application Number:

平成11年特許願第084399号

出 願 人

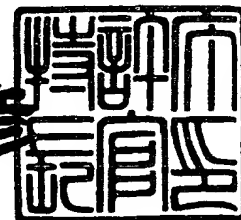
Applicant (s):

柚 源一郎  
高橋 幸則  
水野 傳一  
大鵬薬品工業株式会社PRIORITY  
DOCUMENTSUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 4月28日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

近 藤 隆 彦



出証番号 出証特2000-3030330

【書類名】 特許願  
【整理番号】 S29909  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 C08B 37/00  
【発明者】

【住所又は居所】 東京都世田谷区東玉川 1 - 1 0 - 2 1

【氏名】 柚 源一郎

【発明者】

【住所又は居所】 山口県下関市稗田中町 5 - 4 3 - 3 0 4

【氏名】 高橋 幸則

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県鎌倉市岡本 1 丁目 2 1 番 2 0 号

【氏名】 水野 傳一

【特許出願人】

【識別番号】 390025210

【氏名又は名称】 柚 源一郎

【特許出願人】

【住所又は居所】 山口県下関市稗田中町 5 - 4 3 - 3 0 4

【氏名又は名称】 高橋 幸則

【特許出願人】

【住所又は居所】 神奈川県鎌倉市岡本 1 丁目 2 1 番 2 0 号

【氏名又は名称】 水野 傳一

【特許出願人】

【識別番号】 000207827

【氏名又は名称】 大鵬薬品工業株式会社

【代表者】 小林 幸雄

【代理人】

【識別番号】 100081536

【弁理士】

【氏名又は名称】 田村 巖

【電話番号】 06-6864-3137

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 020086

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 甲殻類、魚類、動物用薬剤及び飼料

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 グラム陰性の微生物菌体から得られ、タンパク質マーカを用いて SDS-PAGE 法で測定した分子量が  $5000 \pm 2000$  で、高分子量リボポリサッカライドを実質的に含まない、低分子量リボポリサッカライドを有効成分として含有し、甲殻類、魚類及び動物の免疫賦活、感染予防効果を発現することを特徴とする甲殻類、魚類及び動物用薬剤。

【請求項 2】 請求項 1 の記載の低分子量リボポリサッカライドを有効成分として含有することを特徴とする甲殻類、魚類の斃死予防剤。

【請求項 3】 グラム陰性の微生物菌体がパントエア属に属する微生物菌体である請求項 1 の薬剤。

【請求項 4】 グラム陰性の微生物菌体がパントエア・アグロメランスである請求項 3 の薬剤。

【請求項 5】 請求項 1 ～ 4 に記載の薬剤を添加したことを特徴とする甲殻類、魚類及び動物用飼料。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

本発明は、甲殻類、魚類、動物の薬剤及び該薬剤を添加した飼料に係わり、特に免疫賦活、感染予防に著効を示す薬剤と、この薬剤を適宜の割合で添加した飼料に関する。

【0002】

【従来技術】

近年、甲殻類や魚類の養殖産業並びに畜産業が発展するに伴って、細菌病並びにウィルス病が多発し、甚大な経済的被害をもたらしている。甲殻類や魚類の疾病については、クルマエビの急性ウィルス血症、ビブリオ病、ブリの類結節症、腸球菌症、アユの冷水病、シュードモナス病、マダイ、カンパチ、ブリなどのイリドウィルス感染症などの発生が多く、経済的被害が大きい。家畜、家禽など

動物の疾病については、豚の胸膜性肺炎、萎縮性鼻炎、呼吸器病繁殖障害症候群、鶏の大腸菌症、伝染性気管支炎などの発症率が高く、生産性が著しく低下している。これらの病気のうち細菌性疾病については、治療薬として抗生物質や合成抗菌剤が用いられているが、抗菌性物質に対する耐性菌が出現し、十分な治療効果が得られていない。また、使用した薬剤の甲殻類、魚類、家畜及び家禽への残留による公衆衛生上の問題が生じていることから、化学療法に依存しない予防対策が強く望まれている。一方、甲殻類及び魚類のウィルス病については、ワクチンや治療薬が開発されておらず、家畜、家禽のウィルス病に対しては、ワクチンが用いられている病気もあるが、鶏の伝染性気管支炎の例にみられるように、ワクチンの効果が充分でなく、病気が依然として多発している状況にある。

### 【0003】

甲殻類、魚類及び動物の免疫機能の増強と感染症の予防を目的として、ビフィドバクテリウム・サーモフィラム由来のペプチドグリカン（特許第2547371号公報）（特公平6-25067号公報）、バチラス属などグラム陽性菌の細胞壁成分（特公平3-173826号公報）、スエヒロタケ由来の $\beta$ -1,3-グルカン（特公平6-65649号公報）などの多糖類を利用することは、既に知られている。また、リポポリサッカライドが魚類や動物の免疫機能を活性化することは、既に報告されている（Salati, F. and R. Kusuda、日本水産学会誌、53巻、201～204ページ、1987年）（Odean, M. J. ら、Infection and Immunity、58巻、427～432ページ、1990年）。

しかし、本発明の低分子量リポポリサッカライド（以下、低分子量LPSと略す）は、上記のグラム陽性菌由来のペプチドグリカン、細胞壁成分及びキノコ由来の $\beta$ -1,3-グルカンと基本構造及び成分が異なり、特異な脂質リピドAとそれに共有結合したRコアと呼ばれるオリゴ糖、さらにO特異多糖の3成分よりなる物質である。また、既報の研究に用いられたリポポリサッカライド（LPS）は分子量が100万～1000万と、極めて大きく毒性が強いために甲殻類、魚類及び動物に長期間投与して、常時免疫機能を活性化しておくことが不可能であった。さらに、前述の既知の物質は分子量が大きく腸管からの吸収が悪いために、多量の経口投与を必要とし、長期間投与すると免疫機能が低下するものが多か

った。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

既に述べた様に、甲殻類、魚類、家畜及び家禽には種々の感染症が多発し、その結果斃死に至るものもあり、甚大な経済的被害をもたらしている。この背景には、これらの動物が限られた環境で過密に飼育されることによる免疫機能の低下が挙げられる。また、低下した免疫機能を活性化する目的で、既に種々の物質が用いられているが、既往のLPSのように毒性が強いために養殖並びに畜産現場では使用できなかったり、長期間投与すると免疫機能が低下するものが多かった。

本発明の課題は甲殻類、魚類、家畜及び家禽が本来的に備えている免疫機能を、ごく微量で的確に活性化して感染症を予防し、薬物残留などの公衆衛生上の問題のない、安全な甲殻類、魚類、家畜及び家禽を育成するための薬剤を提供することにある。

【0005】

【課題を解決するための手段】

本発明はグラム陰性の微生物菌体から得られ、タンパク質マーカーを用いてSDS-PAGE法で測定した分子量が $5000 \pm 2000$ で、高分子量リボポリサッカライドを実質的に含まない、低分子量リボポリサッカライドを有効成分として含有することを特徴とする甲殻類、魚類及び動物用薬剤、及びこれを添加したことを特徴とする甲殻類、魚類及び動物用飼料に係る。

本発明は、グラム陰性の微生物菌体から例えば特開平8-198902号公報において開示された方法によって精製した物質で、分子量が $5000 \pm 2000$ の低分子量LPSを飼料に添加して、甲殻類及び魚類に投与したところ、甲殻類・魚類が本来的に備えている免疫機能が活性化され、ウィルスや細菌による感染が防御され、斃死が予防されることを確認した。また、動物については、野外の養豚場において、上記の低分子量LPSを子豚の離乳時から1カ月間飼料に添加して経口投与したところ、豚の細菌感染症が予防できたことを確認し、本発明を完成した。

## 【0006】

## 【発明の実施の形態】

本発明の低分子量LPSは、前記したようにグラム陰性の微生物菌体から、例えば特開平8-198902号公報において開示された方法によって得られた分子量が $5000 \pm 2000$ のリポポリサッカライドを言うが、その特徴は従来のLPS（分子量100万～1000万）に比べて動物に対する安全性が高く、顕著な免疫活性化作用及び感染予防効果並びに斃死予防効果を有することにある。

本発明において、グラム陰性の微生物菌体としては例えばパントエア属、サルモネラ属、アエロモナス属、セラチア属、エンテロバクロー属等に属する微生物菌体、その他特開平4-99481号公報に記載のグラム陰性の微生物菌体などを挙げることができる。好ましい微生物はパントエア属に属する微生物であり、より好ましくはパントエア・アグロメランス（*Pantoea agglomerans*）である。

## 【0007】

この発明の低分子量LPSは、グラム陰性の微生物等を、常法により培養し、培地から菌体を集め、集めた菌体から公知の方法、例えば、熱フェノール法[オー・ウエストファール（O. Westphal）編、メソツズ・イン・カーボハイドレート・ケミストリー（*Methods in Carbohydrate Chemistry*）、第5巻、第83ページ、アカデミック・プレス（Academic Press）、1965年]、により抽出し、さらに、陰イオン交換樹脂により精製して製造できる。すなわち、微生物の菌体を蒸留水に懸濁し、この懸濁液を蒸留水および等容量の熱フェノールの混合液に添加して攪拌し、次いで遠心分離して水層を回収し、この水層を透析してフェノールを除去し、限外濾過法により濃縮して粗LPS画分を採取し、この画分を常法の陰イオン交換クロマトグラフィー（例えば、モノQ-セファロースまたはQ-セファロースを使用する）により精製し、常法により脱塩する。

## 【0008】

このようにして得られた精製LPSは特開平4-187640号公報、特開平4-49240号公報、特開平4-99481号公報および特開平5-155778号公報に開示される分子量5,000から6,000程度のLPSと実質的に等しい。さらに、得られた精製、LPSを、例えばデオキシコール酸ナトリウム

等の界面活性剤の存在下でゲル濾過し、低分子量LPSを含有する画分のみを回収し、混在する高分子量LPSを除去することによって、高度に精製された本発明の低分子量LPSを得ることができる。この界面活性剤存在下でのゲル濾過の工程は、特開平4-187640号公報、特開平4-49240号公報および特開平5-155778号公報に開示される分子量5,000から6,000程度のLPSを更に高度に精製するためのものであり、この工程により混在する高分子量LPSが完全に排除されるのである。

## 【0009】

本発明の対象となる甲殻類とは、クルマエビ、ウシエビ、コウライエビ、ガザミ等、全てのエビ類、カニ類を含む。魚類とは、フグ、マダイ、ヒラメ、ウナギ、ニジマス等、全ての魚類を含む。動物とは、豚、鶏、牛、馬、犬、猫等、全ての哺乳類及び鳥類を含む。感染症とはクルマエビ類の急性ウィルス血症、魚類のイリドウィルス感染症、ラブドウィルス病、神経壊死症、伝染性造血器壊死症、類結節症、連鎖球菌症、腸球菌症、ビブリオ病、冷水病、シュードモナス病、滑走細菌症、水カビ病、豚の胸膜性肺炎、萎縮性鼻炎、呼吸器病繁殖障害症候群、鶏の大腸菌症、伝染性気管支炎などのほか、全てのウィルス、マイコプラズマ、細菌、真菌及び寄生虫に起因する感染症を言う。尚、本発明の飼料は特に限定されるものではなく、粉末飼料、固型飼料、モイストペレット飼料、ドライペレット飼料、EP (Extruder Pellet) 飼料、生餌など、どのような飼料でもよい。鶏や哺乳動物の場合、飼料だけでなく飲水に溶解して与えてもよい。

## 【0010】

本発明において低分子量LPSの飼料等への配合量は広い範囲から選択できるが、好ましくは飼料に対して0.000001~0.001重量%、特に好ましくは0.00002~0.00005重量%であるが、これに限定されるものではない。低分子量LPSの投与量は適宜決定すれば良いが、例えば甲殻類、魚類及び動物の体重1kgあたり1日量として1~100 $\mu$ g、好ましくは10~20 $\mu$ gを投与するのがよいが、これに限定されるものではない。

## 【0011】

## 【実施例】



以下に実施例を挙げて本発明について説明するが、これら実施例に何ら限定されるものではない。

#### 【0012】

##### 参考例 1 (低分子量 LPS の製造)

トリプトン (ディフコ社製) 10 g、酵母エキス (ディフコ社製) 5 g、NaCl (和光純薬工業社製、特級) 10 g を蒸留水 1 リットルに添加し、NaOH で pH を 7.5 に調整し、オートクレーブで滅菌し、別に滅菌したグルコース (和光純薬工業社製、特級) を 0.1 % の割合で添加した培地 (以下 L-肉汁培地と記載する) 100 ml の入った 500 ml 容の坂口フラスコに、-80℃ で保存されているパントエア・アグロメランズ (*Pantoea agglomerans*) 保存菌株から単一コロニーを分離して接種し、35℃ で 1 夜振とう培養し、そのまま全量を 1,000 ml の L-肉汁培地の入った 3 リットル容の坂口フラスコに接種し、同様に培養した。

#### 【0013】

さらに、7 リットルの L-肉汁培地の入った 10 リットル容の卓上型ファーマンター (丸菱バイオエンジ社製) に培養した菌体を接種し、同条件で通気培養し、のち集菌し、約 70 g の湿菌体を回収し、これを凍結保存した。凍結保存菌体約 70 g を 500 ml の蒸留水に懸濁し、500 ml の 90 % 熱フェノールを添加して 65~70℃ で 20 分間攪拌し、冷却し、10,000 G、4℃ で 20 分間遠心処理し、水層を回収した。フェノール層を更に 1 回前記と同一の操作を反復し、回収した 2 回の水層を合し、1 夜透析してフェノールを除去し、透析内液を限外濾過装置 (アドヴァンテック・トーヨー社製、UK-200) を用いて分子量 20 万カットオフ膜により 2 気圧の窒素ガス下で限外濾過濃縮した。

#### 【0014】

得られた粗 LPS 凍結乾燥物を蒸留水に溶解し、フィルター滅菌し、緩衝液を添加し、陰イオン交換クロマトグラフィー (ファルマシア社製、Q-セファロー・ファースト・フロー) にかけて、10 mM トリス-HCl (pH 7.5) および 10 mM の NaCl を含む緩衝液で試料溶液をカラムに通液し、200~400 mM NaCl / 10 mM トリス-HCl (pH 7.5) でリムラス活性画分を溶出させ

た。この溶出液を前記と同一条件で限外濾過して脱塩および濃縮し、凍結乾燥し、約 70 g の湿菌体から約 300 mg の精製 LPS を得た。

得られた精製 LPS 100 mg を 5 mg/ml の濃度で可溶化緩衝液 [3% デオキシコール酸ナトリウム (和光純薬社製) 0.2 M 塩化ナトリウム、5 mM EDTA-2Na および 20 mM トリス-塩酸からなり、pH 8.3] に溶解し、精製 LPS 溶液 20 ml をセファクリル S-200 HR カラム (ファルマシア社製) の上部に静かに重層し、溶出緩衝液 [0.25% デオキシコール酸ナトリウム (和光純薬社製)、0.2 M 塩化ナトリウム、5 mM EDTA および 10 mM トリス-塩酸からなり、pH 8.3] により流速 16 ml/時で 800 ml (50 時間) 溶出した。

#### 【0015】

ペリスタポンプ PI (ファルマシア社製) を用いて流速を制御しながら、得られた溶出液を、フラクションコレクター (アドバンテック社製、SF2120) により分画し、最初の 240 ml (24 フラクション分) を廃棄し、その後 10 ml/フラクションで 80 フラクションまで分画した。溶出した各画分について原液または希釈液でフェノール/硫酸法 (福井作蔵、「還元糖の定量法・第2版」、第50~52 ページ、学会出版センター、1990 年) により糖の定量を行い、溶出状態を調べた。得られた溶出状態の結果から、LPS の存在が予想される分画 (フラクション 30~60) のうち、フラクション 37~55 の各フラクション 0.5 ml を用いて SDS-PAGE を行い、LPS の分画パターンを調べた。

その結果、フラクション 45-55 は低分子量 (分子量約 5 kD) LPS のみが認められ、フラクション 37-44 は高分子量および低分子量の両方の LPS が認められたので、フラクション 45-55 の低分子量 LPS 分画を次のとおりさらに精製した。

#### 【0016】

各画分を混合して凍結乾燥し、エタノールに懸濁し、遠心分離によりエタノールに可溶なデオキシコール酸を除去し、低分子量 LPS を不溶性画分に回収した。低分子量 LPS 画分のエタノール処理をさらに 2 回反復し、デオキシコール酸

を除去し、次に70%エタノールに再度懸濁し、遠心分離で緩衝液成分を除去し、この操作をさらに3回反復し、低分子量LPSを不溶性画分に回収し、凍結乾燥し、精製した低分子量LPSを約20mg得た。

## 【0017】

## 実施例1 (甲殻類に対する低分子量LPSの安全性)

平均体重20gのクルマエビを20尾ずつの5群に分け、本発明の低分子量LPSをエビの体重1kgあたり1区には50mg、2区には100mgを、また従来の高分子量LPS(大腸菌由来LPS、E. coli 0111, DIFCO社製)を3区には10mg、4区には20mgとなるように第3腹節筋肉内に投与した。5区にはLPSを含まない生理食塩水を投与した。投与後120時間までのエビの生死を確認し、斃死率を求めた。結果を表1に示した。

## 【0018】

【表1】

| 試験区分               | 斃死尾数/供試尾数 | 斃死率(%) |
|--------------------|-----------|--------|
| 1区低分子量LPS 50mg/kg  | 0/20      | 0      |
| 2区低分子量LPS 100mg/kg | 0/20      | 0      |
| 3区高分子量LPS 10mg/kg  | 13/20     | 65     |
| 4区高分子量LPS 20mg/kg  | 20/20     | 100    |
| 5区生理食塩水区           | 0/20      | 0      |

## 【0019】

表1から明らかなように、高分子量LPSの10mg及び20mg区の斃死率がそれぞれ65、100%であったのに対して、低分子量LPSの50mg区及び100mg区は、いずれも斃死する個体が全くみられなかった。このことから、本発明の低分子量LPSは従来の高分子量LPSに比べて、エビに対する安全性が極めて高い物質であることが明らかである。

## 【0020】

## 実施例2 (魚類に対する低分子量LPSの安全性)

平均体重85gのマゴイを40尾ずつ3群に分け、マゴイの体重1kg当たり、1区には低分子量LPS 100mgを、2区には高分子量LPS(E. coli 0111, DIFCO社製) 20mgを、いずれも背部筋肉内に投与した。3区にはLPSを含まない生理食塩水を投与した。投与後120時間までのマゴイの

生死を確認し、斃死率を求めた。結果を表2に示した。

【0021】

【表2】

| 試 験 区 分            | 斃死尾数／供試尾数 | 斃死率 (%) |
|--------------------|-----------|---------|
| 1区低分子量LPS 100mg/kg | 0/40      | 0       |
| 2区高分子量LPS 20mg/kg  | 34/40     | 85      |
| 3区生理食塩水区           | 0/40      | 0       |

【0022】

表2から明らかなように、高分子量LPS 20mg区の斃死率が85%であったのに対して、低分子量LPS 100mg区は斃死する個体が全くみられなかった。このことから、本発明の低分子量LPSは従来的高分子量LPSに比べて、魚類に対する安全性が極めて高い物質であることが明らかである。

【0023】

実施例3 (動物に対する低分子量LPSの急性毒性)

7週齢のC3H/Heマウスの雄を4匹ずつの7群に分け、生理食塩水に溶解した本発明の低分子量LPSをマウスの体重1kg当たり1区には40 $\mu$ g、2区には80 $\mu$ g、3区には160 $\mu$ gを、また従来的高分子量LPSを4区には5 $\mu$ g、5区には10 $\mu$ g、6区には20 $\mu$ gとなるように静脈内に投与した。7区には生理食塩水のみを投与した。投与後72時間までのマウスの生死を確認し、LD<sub>50</sub>値を求めた。結果を表3に示した。

【0024】

【表3】

| 試 験 区 分            | 死亡匹数／<br>供試匹数 | 死亡率<br>(%) | LD <sub>50</sub><br>(mg/kg) |
|--------------------|---------------|------------|-----------------------------|
| 1区低分子量LPS 40mg/kg  | 0/4           | 0          | 57                          |
| 2区低分子量LPS 80mg/kg  | 4/4           | 100        |                             |
| 3区低分子量LPS 160mg/kg | 4/4           | 100        |                             |
| 4区高分子量LPS 5mg/kg   | 1/4           | 25         | 7                           |
| 5区高分子量LPS 10mg/kg  | 3/4           | 75         |                             |
| 6区高分子量LPS 20mg/kg  | 4/4           | 100        |                             |
| 7区生理食塩水区           | 0/4           | 0          |                             |

【0025】

表3から明らかなように、高分子量LPSを静脈内投与したマウスの死亡率は5mg区が25%、10mg区が75%、20mg区が100%となり、LD50が7mg/kgであったのに対して、低分子量LPSを投与したマウスの死亡率は、40mg区が0%、80及び160mg区が100%となり、LD50が57mg/kgであった。このことから、本発明の低分子量LPSは従来の高分子量LPSに比べて、哺乳動物に対する毒性が極めて低い物質であることが明らかである。

## 【0026】

## 実施例4 (甲殻類における血球の食食能に対する活性化作用)

平均体重20gのクルマエビを20尾ずつの6群に分け、本発明区の1、2、3区には低分子量LPSをエビの体重1kg当たり1日量として、それぞれ20、40、100 $\mu$ gを、また高分子量LPSを4区には100 $\mu$ g、5区には1000 $\mu$ gとなるように飼料に混合して7日間投与した。6区にはLPSを含まない飼料を与えた。投与開始0、1、5、7日後に、抗凝固剤としてのL-システインを含むK-199培地を入れた注射器を用いてエビの胸洞から採血し、遠心分離によって血球を得た。懸濁液1 $\mu$ l当たり $1 \times 10^5$ 細胞の血球と $1 \times 10^8$ 個のラテックスビーズ(直径1.986 $\mu$ m)を混合し、25℃で30分間反応させたのち、グルタルアルデヒドで固定後、風乾した。風乾後、ギムザ液で染色し、オイキットを用いてスライドガラス上に固定した。この標本をエビ1尾当たり5枚作製し、落射蛍光顕微鏡を用いて標本1枚当たり200個の血球を無作為に観察し、血球のラテックスビーズ食食率、血球1細胞当たりのビーズ取り込み数を調べ、下式によって食食指数を求めた。

$$\text{食食率} = [\text{ビーズを取り込んだ血球数} / \text{観察した血球の総数}] \times 100$$

$$\text{平均取り込み数} = \text{血球に取り込まれたビーズ数} / \text{ビーズを取り込んだ血球数}$$

$$\text{食食指数} = [\text{ビーズを取り込んだ血球数} / \text{観察した血球の総数}] \times [\text{血球に取り込まれたビーズ数} / \text{観察した血球の総数}] \times 100$$

## 【0027】

試験結果：甲殻類の生体防御機構は、細胞性因子と液性因子によって構成されており、前者には異物に対する血球の食食能が深く関与していることから、エビの

生体防御能が活性化しているか否かは、異物に対する血球の貪食活性を調べることによって明らかになる[高橋幸則ら：魚病研究 30 (2)、141~150 (1995)]。そこで、本発明の低分子量 LPS 区及び高分子量 LPS 区における投与開始 0、1、5、7 日後の貪食指数を調べ、表 4 に示した。

【0028】

【表 4】

| 試験区分                     | 血球の貪食指数        |                   |
|--------------------------|----------------|-------------------|
|                          | 0              | 1 (日後)            |
| 1区低分子量LPS20 $\mu$ g/kg   | 0.9 $\pm$ 0.18 | 2.1 $\pm$ 0.61 ※2 |
| 2区低分子量LPS40 $\mu$ g/kg   | 0.9 $\pm$ 0.18 | 3.3 $\pm$ 1.16 ※2 |
| 3区低分子量LPS100 $\mu$ g/kg  | 0.9 $\pm$ 0.18 | 3.8 $\pm$ 1.00 ※2 |
| 4区高分子量LPS100 $\mu$ g/kg  | 0.9 $\pm$ 0.18 | 0.7 $\pm$ 0.31    |
| 5区高分子量LPS1000 $\mu$ g/kg | 0.9 $\pm$ 0.18 | 1.1 $\pm$ 0.63    |
| 6区LPS無添加飼料区              | 0.9 $\pm$ 0.18 | 0.5 $\pm$ 0.24    |

| 試験区分                     | 血球の貪食指数           |                   |
|--------------------------|-------------------|-------------------|
|                          | 5                 | 7 (日後)            |
| 1区低分子量LPS20 $\mu$ g/kg   | 3.2 $\pm$ 0.71 ※2 | 8.4 $\pm$ 1.37 ※2 |
| 2区低分子量LPS40 $\mu$ g/kg   | 4.5 $\pm$ 0.75 ※2 | 3.7 $\pm$ 1.02 ※2 |
| 3区低分子量LPS100 $\mu$ g/kg  | 3.1 $\pm$ 0.94 ※2 | 2.8 $\pm$ 0.70 ※1 |
| 4区高分子量LPS100 $\mu$ g/kg  | 0.7 $\pm$ 0.82    | 1.2 $\pm$ 0.44    |
| 5区高分子量LPS1000 $\mu$ g/kg | 2.1 $\pm$ 0.58 ※1 | 2.9 $\pm$ 0.68 ※1 |
| 6区LPS無添加飼料区              | 0.7 $\pm$ 0.5     | 1.1 $\pm$ 0.56    |

※1：6区との間に有意差 ( $P < 0.05$ )

※2：6区との間に有意差 ( $P < 0.01$ )

【0029】

表 4 から明らかなように、低分子量 LPS を投与したエビにおける血球の貪食指数は、いずれの本発明区ともに 6 区に比べて高く、有意な差が見られた ( $P < 0.01$ 、 $0.05$ )。しかし、従来的高分子量 LPS を 100 $\mu$ g 投与したエビにおける血球の貪食指数は投与 1、5、7 日後ともに上昇せず、1000 $\mu$ g 区においては投与 5、7 日後に 6 区よりも有意に高くなった ( $P < 0.05$ )。以上のことから、本発明の低分子量 LPS は高分子量 LPS よりも極めて微量で、

エビ血球の食食活性などの生体防御能を活性化することが明らかである。

【0030】

実施例 5 (甲殻類における血球のフェノールオキシダーゼに対する活性化作用)

平均体重 20 g のクルマエビを 20 尾ずつの 6 群に分け、本発明区の 1、2、3 区には低分子量 LPS をエビの体重 1 kg 当たり 1 日量として、それぞれ 20、40、100  $\mu$ g を、また高分子量 LPS を 4 区には 100  $\mu$ g、5 区には 1000  $\mu$ g となるように飼料に混合して 7 日間投与した。6 区には LPS を含まない飼料を与えた。投与開始 0、1、5、7 日後に、EDTA を含む KHE 培地を入れた注射器を用いてエビの胸洞から採血し、遠心分離によって血球を得た。得られた血球を Ca-Mg HEPES 培地に  $1 \times 10^6$  細胞/ml となるように懸濁したのち、凍結融解と超音波によって破壊し、遠心分離によって得られた上清をメンブレンフィルターでろ過した。この液 900  $\mu$ l と基質溶液としての L-DOPA 溶液 100  $\mu$ l を混合後、60℃ 温度下で 60 分間反応させ、分光光度計を用いて 490 nm における吸光度を測定し、フェノールオキシダーゼ (PO) 活性とした。

【0031】

試験結果：甲殻類の生体防御機構は、細胞性因子と液性因子によって構成されており、後者には血球の PO 活性が深く関与していることから、エビの生体防御能が活性化しているか否かは、PO 活性を調べることによっても明らかになる。そこで、本発明の低分子量 LPS 区及び高分子量 LPS 区における投与開始 0、1、5、7 日後の PO 活性を調べ、表 5 に示した。

【0032】

【表 5】

| 試験区分                         | PO活性 (吸光度・490nm) |          |          |          |
|------------------------------|------------------|----------|----------|----------|
|                              | 0                | 1        | 5        | 7 (日後)   |
| 1区低分子量<br>LPS20 $\mu$ g/kg   | 0.092            | 0.105    | 0.199 ※1 | 0.405 ※2 |
| 2区低分子量<br>LPS40 $\mu$ g/kg   | 0.092            | 0.115    | 0.201 ※1 | 0.325 ※2 |
| 3区低分子量<br>LPS100 $\mu$ g/kg  | 0.092            | 0.166 ※1 | 0.170 ※1 | 0.292 ※2 |
| 4区高分子量<br>LPS100 $\mu$ g/kg  | 0.092            | 0.093    | 0.124    | 0.138    |
| 5区高分子量<br>LPS1000 $\mu$ g/kg | 0.092            | 0.104    | 0.197 ※1 | 0.230 ※1 |
| 6区LPS無添加飼料区                  | 0.092            | 0.093    | 0.136    | 0.123    |

※1：6区との間に有意差 ( $P < 0.05$ )

※2：6区との間に有意差 ( $P < 0.01$ )

## 【0033】

表5から明らかなように、低分子量LPSを投与したエビにおける血球のPO活性は、いずれの本発明区ともに6区に比べて高く、有意な差がみられた ( $P < 0.01$ 、 $0.05$ )。しかし、従来的高分子量LPSを100 $\mu$ g投与したエビにおける血球のPO活性は投与7日後まで上昇せず、1000 $\mu$ g区においては投与5、7日後に6区よりも有意に高くなった ( $P < 0.05$ )。以上のことから、本発明の低分子量LPSは高分子量LPSよりも極めて微量で、エビ血球のPO活性などの生体防御能を活性化することが明らかである。

## 【0034】

実施例6 (クルマエビ急性ウィルス血症に対する予防効果)

平均体重14gのクルマエビを20尾ずつの5群に分け、本発明区の1、2、3区には低分子量LPSをエビの体重1kg当たり1日量として、それぞれ20、40、100 $\mu$ gを、また4区には高分子量LPSを1000 $\mu$ gとなるように飼料に混合して18日間投与した。5区の対照区には、LPSを含まない飼料を与えた。

## 【0035】

LPSを投与開始8日後に、クルマエビ急性ウィルス血症の原因ウィルスであるPRDV (penaeid rod-shaped DNA virus) を用いて感染試験を行った。



感染方法は、本病によって斃死した3尾のクルマエビの頭胸部甲皮を剥がしたのち、40mlの滅菌海水中でホモジナイズし、遠心分離（10,000×g、10分間、4℃）によって得られた上清10mlを20リットルの海水に加えた。この中にLPSを投与開始8日後のエビを2時間浸漬する方法によって感染させた。感染後10日間の斃死状況を観察し、斃死したエビについては病理学的及びPCR（Polymerase chain reaction）法による検査を行ってPRDVによる斃死であることを確認した。

## 【0036】

試験結果：本発明の低分子量LPS区、高分子量LPS区及びLPS無添加区のPRDV感染後におけるクルマエビの累積斃死尾数と斃死率を表6～7に示した。

## 【0037】

【表6】

| 試験区分                          | 感染後の経過日数 |   |    |    |    |
|-------------------------------|----------|---|----|----|----|
|                               | 1        | 2 | 3  | 4  | 5  |
| 1区低分子量<br>LPS 20 $\mu$ g/kg   | 0        | 0 | 0  | 2※ | 3  |
| 2区低分子量<br>LPS 40 $\mu$ g/kg   | 0        | 0 | 3  | 4  | 4  |
| 3区低分子量<br>LPS 100 $\mu$ g/kg  | 1        | 1 | 3  | 3  | 4  |
| 4区高分子量<br>LPS 1000 $\mu$ g/kg | 1        | 1 | 6  | 6  | 6  |
| 5区LPS無添加区                     | 2        | 4 | 13 | 14 | 15 |

※数字は累積斃死尾数を示す（他も同じ）

## 【0038】

【表 7】

| 試 験 区 分                       | 感染後の経過日数 |    |    |    |    | 斃死率   |
|-------------------------------|----------|----|----|----|----|-------|
|                               | 6        | 7  | 8  | 9  | 10 |       |
| 1区低分子量<br>LPS 20 $\mu$ g/kg   | 3        | 3  | 4  | 4  | 4  | 20*** |
| 2区低分子量<br>LPS 40 $\mu$ g/kg   | 6        | 6  | 6  | 7  | 7  | 35*** |
| 3区低分子量<br>LPS 100 $\mu$ g/kg  | 5        | 6  | 8  | 8  | 8  | 40*** |
| 4区高分子量<br>LPS 1000 $\mu$ g/kg | 9        | 9  | 10 | 11 | 11 | 55**  |
| 5区LPS無添加区                     | 18       | 18 | 19 | 20 | 20 | 100   |

※※5区との間に有意差 ( $P < 0.05$ )

※※※5区との間に有意差 ( $P < 0.01$ )

【0039】

PRDVによる感染後に、LPS無添加飼料を与えた対照区のエビは9日以内に100%が斃死したのに対し、本発明区の斃死率は低分子量LPS 20  $\mu$ g区が20%、40  $\mu$ g区が35%、100  $\mu$ g区が40%といずれも低く、対照区との間に有意な差がみられた ( $P < 0.01$ )。一方、高分子量LPSを1000  $\mu$ g投与したエビの斃死率は55%であり、低分子量LPSを投与した各区に比べて多数のエビが斃死した。以上の結果から、本発明の低分子量LPSはエビのウィルスによる感染を防御し、その効果は従来的高分子量LPSよりもすぐれていることが明らかである。

【0040】

#### 実施例 7 (魚類の免疫機能に対する活性化作用)

平均体重230gのブリを20尾ずつの6群に分け、本発明の1、2、3区には低分子量LPSをブリの体重1kg当たり1日量として、それぞれ20、40、100  $\mu$ gを、また高分子量LPSを4区には100  $\mu$ g、5区には1000  $\mu$ gとなるようにモイストペレットに混合して7日間投与した。6区にはLPSを含まないモイストペレットを与えた。投与開始0、1、5、7日後に5尾ずつのブリから頭腎を摘出し、0.25%NaCl添加RPMI-1640-HAH培地を入れたプラスチックシャーレ内で血球細胞を分離し、細胞ろ過器に通して細

胞懸濁液を得た。この液をpercoll不連続密度勾配上に重層したのち、1600 rpm、20分間（4℃）の遠心分離を行って白血球層を得た。

## 【0041】

この層を採取後、遠心洗浄して10%FBS（Fetal Bovine Serum）を含む0.25%NaCl添加RPMI-1640-H培地に懸濁し、白血球の細胞数を $1 \times 10^6$ 細胞/mlに調整した。この白血球懸濁液500 $\mu$ lと、ブリ血清でオプソニン化しておいた酵母の懸濁液（ $1 \times 10^8$ 細胞/ml）500 $\mu$ lをシリコン処理したガラス試験管に入れ、10分おきに攪拌しながら25℃で60分間インキュベートした。インキュベート終了後、ブリ1個体当たり5枚の塗抹標本を作製し、ライト染色を施してオイキットで封入した。さらに、光学顕微鏡によって1標本あたり200細胞の血球を無作為に観察し、白血球の酵母貪食数を調べ、実施例4と同様の計算式によって貪食指数を求めた。結果を表8～9に示した。

## 【0042】

【表8】

| 試験区分                          | 白血球の貪食指数       |                    |
|-------------------------------|----------------|--------------------|
|                               | 0              | 1（日後）              |
| 1区低分子量<br>LPS 20 $\mu$ g/kg   | 7.3 $\pm$ 2.30 | 12.7 $\pm$ 2.65 ※1 |
| 2区低分子量<br>LPS 40 $\mu$ g/kg   | 7.3 $\pm$ 2.30 | 17.9 $\pm$ 3.99 ※2 |
| 3区低分子量<br>LPS 100 $\mu$ g/kg  | 7.3 $\pm$ 2.30 | 18.6 $\pm$ 4.12 ※2 |
| 4区高分子量<br>LPS 100 $\mu$ g/kg  | 7.3 $\pm$ 2.30 | 6.3 $\pm$ 2.24     |
| 5区高分子量<br>LPS 1000 $\mu$ g/kg | 7.3 $\pm$ 2.30 | 8.2 $\pm$ 2.18     |
| 6区LPS無添加飼料区                   | 7.3 $\pm$ 2.30 | 6.6 $\pm$ 1.19     |

1：6区との間に有意差（ $P < 0.05$ ）

2：6区との間に有意差（ $P < 0.01$ ）

## 【0043】

【表 9】

| 試 験 区 分                       | 白 血 球 の 食 食 指 数    |                    |
|-------------------------------|--------------------|--------------------|
|                               | 5                  | 7 (日後)             |
| 1区低分子量<br>LPS 20 $\mu$ g/kg   | 39.2 $\pm$ 2.54 ※2 | 52.7 $\pm$ 4.08 ※2 |
| 2区低分子量<br>LPS 40 $\mu$ g/kg   | 37.4 $\pm$ 4.28 ※2 | 37.0 $\pm$ 3.11 ※2 |
| 3区低分子量<br>LPS 100 $\mu$ g/kg  | 42.6 $\pm$ 5.35 ※2 | 36.5 $\pm$ 4.32 ※1 |
| 4区高分子量<br>LPS 100 $\mu$ g/kg  | 11.2 $\pm$ 3.05    | 10.6 $\pm$ 2.96    |
| 5区高分子量<br>LPS 1000 $\mu$ g/kg | 22.7 $\pm$ 3.16 ※1 | 31.8 $\pm$ 3.52 ※1 |
| 6区LPS無添加飼料区                   | 9.0 $\pm$ 0.204    | 7.7 $\pm$ 1.73     |

※1：6区との間に有意差 ( $P < 0.05$ )

※※2：6区との間に有意差 ( $P < 0.01$ )

【0044】

表8～9から明らかなように、低分子量LPSを投与したブリにおける白血球の食食指数は、いずれの発明区ともに6区に比べて高く、有意な差がみられた ( $P < 0.01$ 、 $0.05$ )。しかし、従来的高分子量LPSを100  $\mu$ g投与したブリにおける白血球の食食指数は、投与7日後まで上昇せず、1000  $\mu$ g区においては投与5日後以降に6区よりも有意に高くなった ( $P < 0.01$ )。以上のことから、本発明の低分子量LPSは高分子量LPSよりも極めて微量で、白血球の食食作用などの魚類の免疫機能を活性化することが明らかである。

【0045】

実施例8 (ブリの腸球菌症に対する予防効果)

平均体重63gのブリを30尾ずつの5群に分け、本発明の1、2、3区には低分子量LPSをエビの体重1kg当り1日量として、それぞれ20、40、100  $\mu$ gを、また4区には高分子量LPSを1000  $\mu$ gとなるようにモイストペレットに混合して、毎日投与した。5区の対照区には、LPSを含まないモイストペレットを与えた。投与開始7日後にブリの腸球菌症の原因菌 *Enterococcus seriolicida* をブリ1尾当たり  $4.0 \times 10^6$  細胞となるように腹腔内接種し、接種後15日間の斃死率を求めた。結果を表10～11に示した。

【0046】

【表10】

| 試験区分                         | 感染後の経過日数 |   |   |   |   |   |    |    |    |
|------------------------------|----------|---|---|---|---|---|----|----|----|
|                              | 1        | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7  | 8  | 9  |
| 1区低分子量<br>LPS20 $\mu$ g/kg   | 0        | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0  | 0  | 1※ |
| 2区低分子量<br>LPS40 $\mu$ g/kg   | 0        | 0 | 0 | 1 | 1 | 2 | 2  | 4  | 4  |
| 3区低分子量<br>LPS100 $\mu$ g/kg  | 0        | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 3  | 3  | 5  |
| 4区高分子量<br>LPS1000 $\mu$ g/kg | 0        | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 3  | 3  | 3  |
| 5区LPS無添加区                    | 0        | 0 | 1 | 2 | 7 | 7 | 10 | 12 | 16 |

※数字は累積斃死尾数を示す（他も同じ）

【0047】

【表11】

| 試験区分                         | 感染後の経過日数 |    |    |    |    |    | 斃死率 (%) |
|------------------------------|----------|----|----|----|----|----|---------|
|                              | 10       | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 |         |
| 1区低分子量<br>LPS20 $\mu$ g/kg   | 3        | 3  | 3  | 3  | 4  | 4  | 13.3※※※ |
| 2区低分子量<br>LPS40 $\mu$ g/kg   | 7        | 8  | 8  | 8  | 8  | 8  | 26.7※※  |
| 3区低分子量<br>LPS100 $\mu$ g/kg  | 5        | 5  | 5  | 7  | 7  | 7  | 23.3※※  |
| 4区高分子量<br>LPS1000 $\mu$ g/kg | 5        | 9  | 10 | 10 | 11 | 11 | 36.7※※  |
| 5区LPS無添加区                    | 16       | 16 | 17 | 22 | 22 | 22 | 73.3    |

※※5区との間に有意差 ( $P < 0.05$ )

※※※5区との間に有意差 ( $P < 0.01$ )

【0048】

E. Seriolicidaを接種して15日後に、LPS無添加飼料を与えた対照区のブリの73.3%が斃死したのに対し、本発明区の斃死率は低分子量LPS20 $\mu$ g区が13.3%、40 $\mu$ g区が26.7%、100 $\mu$ g区が23.3%といずれも低く、対照区との間に有意な差が見られた ( $P < 0.05$ )。一方、高分子量LPSを1000 $\mu$ g投与したブリの斃死率は36.7%であり、低分子量L

P Sの各区に比べて高い斃死率を示した。以上の結果から、本発明の低分子量L P Sは魚類の細菌による感染を防御し、その効果は従来的高分子L P Sよりもすぐれていることが明らかになった。

【0049】

実施例9 (豚萎縮性鼻炎に対する予防効果)

試験方法：養豚場において、ほぼ同時期に産出された4腹からの子豚、計36頭を離乳時に腹、性別、体重及び萎縮性鼻炎原因菌(*Bordetella bronchiseptica*)の保菌率に差がないように、18頭ずつの2群に分け、本発明の1区には低分子量L P Sを子豚の体重1kg当たり1日量として20 $\mu$ gとなるように配合飼料に混合し、子豚の離乳時(平均体重6.9kg)から30日間投与した。対照区の2区にはL P Sを含まない配合飼料を与えた。低分子量L P Sを投与開始時と終了時に*B. bronchiseptica*の保菌率及び病原菌に対する抗体の陽性率を調べるとともに豚の体重を測定し、増体重量を求めた。

【0050】

*B. bronchiseptica*保菌率は、滅菌した綿棒を豚の鼻腔内に挿入し、1%ブドウ糖加マッコンキー寒天培地に塗抹後、37℃、48時間培養する方法によって調べた。分離菌の同定は生化学的性状検査及びウサギ免疫血清によるスライド凝集反応によって行った。凝集抗体価は、豚の頸静脈から採血し、3000rpm、10分間の遠心分離を行って血清を分離したのち、試験管内凝集反応によって凝集価を測定し、凝集価10倍以上を陽性とした。

【0051】

試験結果：本発明の低分子量L P S区と対照区の試験開始時と終了時における病原菌保菌率、病原菌に対する抗体の陽性率及び豚の増体重量を表12～13に示した。

【0052】

【表 12】

| 試験区分                       | 病原菌保菌率(%)      |                 | 抗体陽性率(%)    |                |
|----------------------------|----------------|-----------------|-------------|----------------|
|                            | 開始時            | 終了時             | 開始時         | 終了時            |
| 1区低分子量LPS<br>20 $\mu$ g/kg | 11.1<br>(2/18) | 5.6※<br>(1/18)  | 0<br>(0/18) | 5.6※<br>(1/18) |
| 2区<br>対照区                  | 11.1<br>(2/18) | 61.1<br>(11/18) | 0<br>(0/18) | 38.9<br>(7/18) |

※対照区との間に有意差 ( $P < 0.05$ )

【0053】

【表 13】

| 試験区分                       | 体重 (kg)           |                    | 増体重量<br>(kg)       |
|----------------------------|-------------------|--------------------|--------------------|
|                            | 開始時               | 終了時                |                    |
| 1区低分子量LPS<br>20 $\mu$ g/kg | 6.7<br>$\pm 1.83$ | 17.8<br>$\pm 3.26$ | 11.1<br>$\pm 2.04$ |
| 2区<br>対照区                  | 6.7<br>$\pm 2.02$ | 16.1<br>$\pm 3.77$ | 9.4<br>$\pm 2.44$  |

※対照区との間に有意差 ( $P < 0.05$ )

【0054】

試験終了時における *B. bronchiseptica* 保菌率及び抗体陽性率は、対照区がそれぞれ 61.3%、38.9%であったのに対し、低分子量LPSを離乳時から30日間投与した区においては、保菌率、抗体陽性率ともに5.6%と低く、対照区との間に有意な差が見られた ( $P < 0.05$ )。また、試験終了時の増体重量は、対照区が9.4 kgであったのに対し、低分子量LPS区が11.1 kgであり、対照区に比べて低分子量LPS区の成長がすぐれていた。以上の結果から、本発明の低分子量LPSは豚の細菌感染症に対しても防御効果を有することが明らかになった。また、本病に罹病した豚は、発育障害を起こすことが知られていることから、低分子量LPS区の増重量がすぐれていた原因は、LPSの投与によって本病が予防できた結果であると推察される。

【0055】

【発明の効果】

本発明によれば、甲殻類、魚類、家畜及び家禽が本来的に備えている免疫機能

を、ごく微量で的確に活性化して感染症を予防し、また、甲殻類、魚類の斃死を  
予防し、薬物残留などの公衆衛生上の問題のない、安全な甲殻類、魚類、家畜及  
び家禽を育成するための薬剤を提供することができる。



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 甲殻類、魚類、家畜及び家禽が本来的に備えている免疫機能を、ごく微量で的確に活性化して感染症を予防し、また、甲殻類、魚類の斃死を予防し、薬物残留などの公衆衛生上の問題のない、安全な甲殻類、魚類、家畜及び家禽を育成するための薬剤を提供する。

【解決手段】 グラム陰性の微生物菌体から得られ、タンパク質マーカを用いて SDS-PAGE 法で測定した分子量が  $5000 \pm 2000$  で、高分子量リボポリサッカライドを実質的に含まない、低分子量リボポリサッカライドを有効成分として含有することを特徴とする甲殻類、魚類及び動物用薬剤、及びこれを添加したことを特徴とする甲殻類、魚類及び動物用飼料。

【選択図】 なし

認定 - 付加情報

|         |                    |
|---------|--------------------|
| 特許出願の番号 | 平成11年 特許願 第084399号 |
| 受付番号    | 59900282652        |
| 書類名     | 特許願                |
| 担当官     | 第六担当上席 0095        |
| 作成日     | 平成11年 4月 9日        |

<認定情報・付加情報>

【提出日】

平成11年 3月26日

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [390025210]

1. 変更年月日 1990年11月20日  
[変更理由] 新規登録  
住 所 東京都世田谷区東玉川1-10-21  
氏 名 柚 源一郎

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000207827]

|          |                 |
|----------|-----------------|
| 1. 変更年月日 | 1990年 8月10日     |
| [変更理由]   | 新規登録            |
| 住 所      | 東京都千代田区神田錦町1-27 |
| 氏 名      | 大鵬薬品工業株式会社      |

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[599045545]

1. 変更年月日 1999年 3月26日

[変更理由] 新規登録

住 所 山口県下関市稗田中町5-43-304

氏 名 高橋 幸則

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[599045556]

1. 変更年月日 1999年 3月26日

[変更理由] 新規登録

住 所 神奈川県鎌倉市岡本1丁目21番20号

氏 名 水野 傳一